

Aus der Hals- Nasen- und Ohrenklinik der medizinischen
Einrichtungen der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. K.-H. Vosteen

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIONSAKTIVITÄT
MENSCHLICHER OROPHARYNX-GEWÜLSTE NACH TRANSPLANTATION
AUF THYMUSAPLASTISCHE NU/NU MÄUSE.

AUTORADIOGRAPHIE
UND
FLÜSSIGKEITS-SZINTILLATIONS-SPEKTROMETRIE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Zahnmedizin
der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Klaus-Dieter Stumpe

1979

Aus der Hals- Nasen- und Ohrenklinik der medizinischen
Einrichtungen der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. K.-H. Vosteen

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIONSAKTIVITÄT
MENSCHLICHER OROPHARYNX-GESCHWÜLSTE NACH TRANSPLANTATION
AUF THYMUSAPLASTISCHE NU/NU MÄUSE.

AUTORADIOGRAPHIE
UND
FLÜSSIGKEITS-SZINTILLATIONS-SPEKTROMETRIE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Zahnmedizin
der medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Klaus-Dieter Stumpe

1979



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Reinauer

Referent
gez.: Prof. Dr. Ganzer
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Schübel

Meiner Frau Ingrid gewidmet

Inhaltsübersicht

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methode	4
2.1. Versuchstiere und Transplantationstechnik	4
2.2. In-vivo Markierung mit ^3H -Thymidin	5
2.3. Autoradiographie	6
2.4. Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie	8
2.4.1. Erste Versuchsserie	8
2.4.2. Zweite Versuchsserie	9
2.5. Proteinbestimmung	11
2.6. DNA-Bestimmung	12
3. Ergebnisse	14
4. Diskussion	17
4.1. Diskussion der Methodik	19
4.2. Diskussion der Ergebnisse	25
5. Schlußfolgerungen	32
6. Zusammenfassung	33
7. Tabellen und Abbildungen	35
8. Literatur	49
9. Lebenslauf	54
10. Danksagung	55



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41533924_0002

Vergleichende Untersuchungen zur Proliferationsaktivität
menschlicher Oropharynx-Geschwülste nach Transplantation
auf thymusaplastische nu/nu Mäuse.

Autoradiographie
und
Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie

1. Einleitung

Die Carcinome des Kopf- und Halsbereiches können wegen ihrer Größe oder ihrer ungünstigen Lokalisation nicht immer mit Aussicht auf Erfolg operiert oder bestrahlt werden. In diesen Fällen lässt sich eine Tumorregression unter Umständen durch eine cytostatische Chemotherapie erreichen. Die Behandlungsergebnisse der Chemotherapie sind allerdings sehr unbefriedigend; eine tatsächliche Heilung des Patienten tritt sehr selten ein.

Für das Versagen der cytostatischen Behandlung sind außer allgemeinen schwerwiegenden Nebenwirkungen beispielsweise auf das Knochenmark im wesentlichen zwei Gründe verantwortlich: Einerseits nimmt stets nur eine relativ geringe Zahl von Tumorzellen am Wachstum der Geschwulst teil. Lediglich diese proliferierenden Zellen können durch das Cytostatikum geschädigt werden. Gegenüber dem wesentlich größeren Anteil nicht proliferierender, ruhender Zellen innerhalb einer Geschwulst ist die Chemotherapie wirkungslos.

Andererseits greifen Cytostatika überwiegend nur in bestimmten Entwicklungsphasen der Tumorzelle an - Bleomycin beispielsweise in der späten S- und in der G₂-Phase (Ganzer 1978) oder Vincristin in der Mitose-Phase (Klein et al. 1972).

Aus diesen Gründen wäre es für den Kliniker von großem Vorteil, wenn er bereits vor Beginn der cytostatischen Behandlung wüßte, wie groß der Anteil proliferierender Zellen innerhalb des Tumors ist und wie sich die Tumorzellen auf die verschiedenen Entwicklungsstadien des Zellzyklus verteilen. Mit dieser Kenntnis wäre er in der Lage, von vornherein das Cytostatikum mit der bestmöglichen Wirksamkeit einzusetzen oder eine Kombination von Cytostatika, die auf verschiedene Entwicklungsstadien der Zelle einwirken, auszuwählen.

Umfassende Untersuchungen über die Verteilung der Tumorzellen über sämtliche Stadien des Zellzyklus sind bei menschlichen Geschwülsten aus technischen und experimentellen Gründen bisher nicht gelungen. Ziemlich genau kann aber der Anteil an Zellen, die sich in der Mitose-Phase befinden, bestimmt werden. Diese Zellen lassen sich nämlich an ihrem typischen Bild im histologischen Präparat erkennen. Diejenigen Zellen, die im Verlauf ihrer Entwicklung gerade die DNA verdoppeln, können nach radioaktiver Markierung mit Hilfe der Autoradiographie ebenfalls sichtbar gemacht werden. Der Anteil derartig markierter Zellen spiegelt etwa die Proliferationsaktivität eines Gewebes wider, da alle proliferierenden Zellen während des Wachstums ihre DNA verdoppeln und somit diesen Zyklusabschnitt durchwandern müssen.

Das autoradiographische Untersuchungsverfahren ist allerdings kompliziert und so zeitaufwendig, daß es als prätherapeutischer Test für die Klinik in der Regel nicht geeignet ist.

Ein anderes Verfahren, den Einbau radioaktiv markierter DNA-Vorstufen in die Zellen und somit die proliferativen Eigenschaften eines Gewebes zu untersuchen, ist die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie. Diese Technik erlaubt es, mit einem für den Patienten vertretbaren Zeitaufwand den DNA - Umsatz des zur Behandlung anstehenden Tumors zu bestimmen. Trotz der weiter unten beschriebenen theoretischen Bedenken hinsichtlich der Vergleichbarkeit autoradiographischer Ergebnisse mit denen der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie ist letztere immer wieder als klinisch anwendbare zellkinetische Untersuchungsmethode empfohlen worden, kürzlich erst von Bastert et al. (1977).

Wegen der grundsätzlichen Bedeutung für den Kliniker haben wir dieses Problem bearbeitet und an einem reproduzierbaren Tumormodell folgende Fragen untersucht:

1. Ist der autoradiographisch gewonnene Markierungsindex mit dem Resultat der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie vergleichbar?
2. Lässt sich mit der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie die Proliferationsaktivität von Tumorgeweben bestimmen?

2. Material und Methode

Untersucht wurden drei verschiedene Plattenepithelcarcinome des Oropharynx, nämlich ein wenig differenziertes, schwach verhornendes Plattenepithelcarcinom des Kehlkopfes (Tumor I), ein wenig differenziertes, schwach verhornendes Plattenepithelcarcinom des Mundbodens (Tumor II) sowie die Halslymphknotenmetastase eines nicht verhornenden Plattenepithelcarcinoms der Tonsille (Tumor III).

Da Probeexcisionen für umfangreichere vergleichende Untersuchungen naturgemäss zu klein sind, wurden die Biopsien zunächst mehrfach auf thymusaplastische Mäuse transplantiert. Dadurch stand reichlich Tumormaterial zur Verfügung.

2. 1. Versuchstiere und Transplantationstechnik

Versuchstiere waren thymusaplastische nu/nu Mäuse des Stammes Balb C, die in Laminar flow Regalen (Fa. Altromin) mit Makrolonkäfigeinschüben gehalten wurden. Die Tiere erhielten als Festfutter zwei unterschiedliche Diäten (Altromin 1006 und 1314) sowie Trinkwasser, dem Antibiotika und Kaliumsorbat beigegeben wurde, ad libitum. Die Einstellung des pH-Wertes von 2,5 erfolgte mit 1N-HCl.

Die Probeexcisionen wurden in schmale Streifen (ca. 1 x 3 x 3 mm) zerschnitten und subcutan beiderseits in die Milchleistenregion der thymusaplastischen Mäuse unter sterilen Bedingungen transplantiert. Die Tiere befanden sich während der Transplantation mittels Narkoseäther in Anästhesie.

Nach drei Tagen wurden die zum Wundverschluß gesetzten Klammern entfernt. Vier bis sechs Wochen nach der Transplantation entnahmen wir die unter der Mäusehaut gewachsenen Tumoren, zerteilten sie und transplantierten sie zur Gewinnung weiterer Tumoren des gleichen Typs erneut auf nackte Mäuse. Die Versuchstiere wogen im Schnitt 25 bis 35 Gramm. Die schließlich für die Untersuchung verwendeten Tumoren hatten ein durchschnittliches Volumen von 0,75 qcm.

2. 2. In-vivo Markierung mit ^3H -Thymidin

Sowohl für die autoradiographische Aufarbeitung als auch für die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie müssen den Tumorzellen radioaktiv markierte Bausteine zum Einbau in ihre DNA angeboten werden. Deswegen erhielten die tumortragenden Mäuse eine einmalige intraperitoneale Injektion von $5\text{ }\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin/g Körpergewicht (^3H -Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 5 Ci/mmol; Amersham-Buchler).

Die Injektion erfolgte bei allen Versuchstieren jeweils zwischen 9,30 und 11,00 Uhr, um tageszeitliche Einbauschwankungen des ^3H -Thymidin zu vermeiden. Zur Bestimmung der Radioaktivität im Serum wurde eine Stunde nach der Injektion venöses Blut entnommen. Anschliessend wurde die Maus im Äthernäusch getötet und der Tumor exstirpiert.

Entsprechend Abb. 1 zerschnitten wir jeden Tumor, pro Maus in der Regel zwei, in vier Teile und untersuchten jedes Viertel nach histologischer Überprüfung sowohl autoradiographisch als auch mit der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie.

2. 3. Autoradiographie

Die zur Autoradiographie vorgesehenen Gewebeteile wurden 24 Stunden in einer 10 %igen Formalin-Lösung, der 0,1 mg inaktives Thymidin pro ml zugesetzt worden war, fixiert. Freies ungebundenes Thymidin wurde dem Gewebe durch mindestens 24 stündiges Wässern entzogen. Nach Dehydrierung über die aufsteigende Alkoholreihe bis zum Benzol erfolgte schließlich die Einbettung in Paraplast. Anschließend wurden die Gewebeproben 5 μ m dick in Serie geschnitten. Zur histologischen Durchmusterung wurde ein Teil der Präparate mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Zur Bestimmung des Markierungsindex färbten wir die Präparate nach Feulgen, weil die Zellkerne mit den darüber befindlichen Silberkörnern deutlicher zu erkennen sind. Für die Färbungen bedienten wir uns der Vorschrift von Romeis (1968).

Die Auswertung der Autoradiogramme erfolgte bei tausendfacher Vergrößerung unter Ölimmersion. Je Tumorviertel wurden 10 000 Zellen ausgezählt, verteilt auf 4 bis 5 weit auseinander liegende Schnitte. Eine Zelle galt dann als markiert, wenn mindestens sechs Silberkörner über dem Zellkern zu erkennen waren. Bei einem Teil der Präparate zählten wir zusätzlich die einzelnen Silberkörner über jeweils 100 Zellkernen und ordneten sie nach steigender Silberkornzahl in Gruppen von 10 Silberkörnern oder einem Vielfachen davon. Zellen mit mehr als 50 Silberkörnern wurden in einer Gruppe zusammengefaßt. Bei den durch Konfluenz oder Konglomeration entstandenen Mehrfachgruppierungen wurde jedes Silberkorn gezählt.

Zur Entwicklung der Präparate wurde eine K 2 Emulsion (Ilford) 2:1 mit Aqua bidest. verdünnt und bei 42° C im Wasserbad geschmolzen. Wir tauchten die Objektträger mit den Präparaten gleichmäßig in die Emulsion, sodaß sie sich mit einer 1 bis 2 μ m dünnen Schicht überzogen und anschließend mehrere Stunden bei Zimmertemperatur trockneten.

Die Expositionszeit der Präparate betrug drei bis vier Wochen in lichtdichten Kästen bei 4°C. Die Entwicklung der Autoradiogramme erfolgte 5 Minuten bei 18°C.

Der Entwickler (Amidol p.a. 1,35 g -Merck 3019-; 5,4g Na₂SO₃; 2,4 ccm 10% KBr; 300,0 ccm Aqua dest.) sollte jeweils kurz vor dem Entwicklungsprozeß angesetzt und filtriert werden. Nach dem Entwicklungsprozeß wurden die Präparate kurz in Aqua dest. gewässert, zehn Minuten in 30%iger Natriumthio-sulfatlösung fixiert und wieder gewässert.

Die Eindeckung der Präparate geschah nach dem Trocknen mit Entellan (Fa. Merck).

2. 4. Flüssigkeits-Szintillations- Spektrometrie

Wir verwendeten zum Nachweis der weichen β -Strahlung des Tumorgewebes den Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer der Firma Packard, Tri-Carb 3320.

Technische Daten und Einstellung des Gerätes:

Verstärkung	50 %
Fensteröffnung	50 - 750

externer Standard:

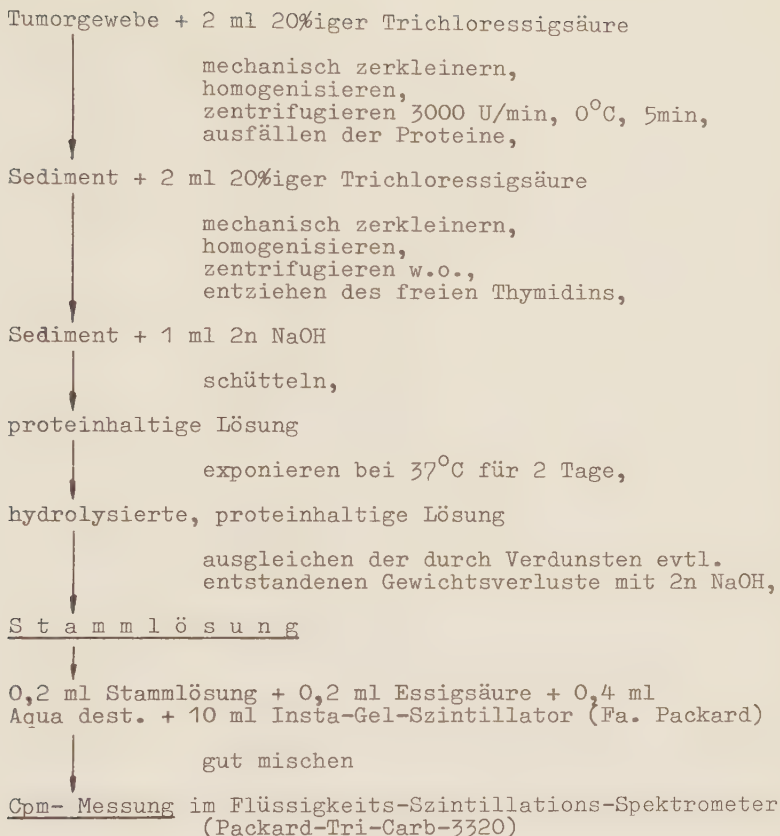
Verstärkung	5 %
Fensteröffnung	1000 - ∞

Die Quenchprobe, durch die evtl. auftretende Energieverluste der zu messenden Probe auf den maximalen Wirkungsgrad umgerechnet werden können, wurde durch Chloroformzusätze in verschiedenen Konzentrationen ermittelt.

Wir teilten die Versuche in eine erste und zweite Versuchsserie. In der ersten Versuchsserie wurden die Cpm-Werte nur auf Protein bezogen. In einer zweiten Versuchsserie bestimmten wir außerdem den DNA-Gehalt der Tumorproben sowie das Trockengewicht.

2. 4. 1. Erste Versuchsserie

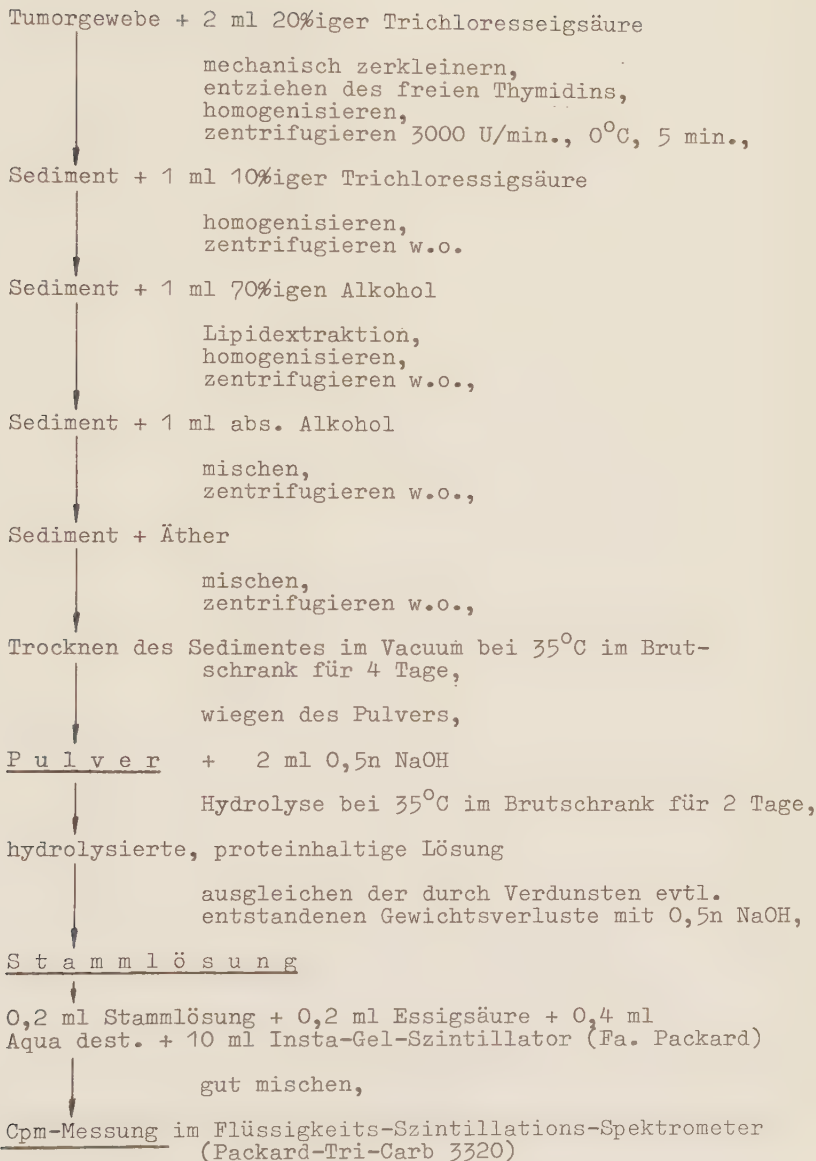
Nach Aufteilung des Tumors in Bezirke arbeiteten wir sofort nach Entnahme des Heterotransplantates das nicht zur Autoradiographie benutzte Material nach der Methode von Schmidt-Thannhauser (1945) wie folgt auf:



2. 4. 2. Zweite Versuchsserie

In der zweiten Versuchsserie ermittelten wir das Tumor-Trockengewicht und bestimmten den Einbau von ^3H -Thymidin in Protein und DNA.

Die Methode zur Gewinnung der Stammlösung änderten wir wie folgt:



Wir führten drei Messungen von jeweils zehn minütiger Dauer durch und bezogen die Impulse (Cpm) auf mg Protein und μ g DNA.

2. 5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte in beiden Versuchsserien nach der Methode von Lowry und Rosebrough (1951) anhand einer Eichkurve, die mit Rinder-Serum-Albumin Lösung (BSA) aufgestellt wurde.

Reagentien:

BSA-Lösung: 200 mg BSA/100 ml 0,1m
Phosphatpuffer pH 7,4

Lösung "A": 20 g Na_2CO_3
4 g NaOH ad 1000 ml Aqua dest.

Lösung "B": 0,5 g Kaliumtartrat
0,25g Kupfersulfat x 5 H_2O
ad 50 ml Aqua dest.

Lösung "C": Mischung der Lösungen "A" + "B"
im Verhältnis 50 : 1

Indikator : 2,0n Folin-Reagenz

Durchführung der Proteinbestimmung:

0,05 ml Stammlösung + 0,75 ml Aqua dest. +
4 ml Lösung "C"



mischen und 15 min. bei Raumtemperatur
stehen lassen,

0,2 ml Folin-Reagenz während des Mischens zugeben



30 Minuten stehen lassen

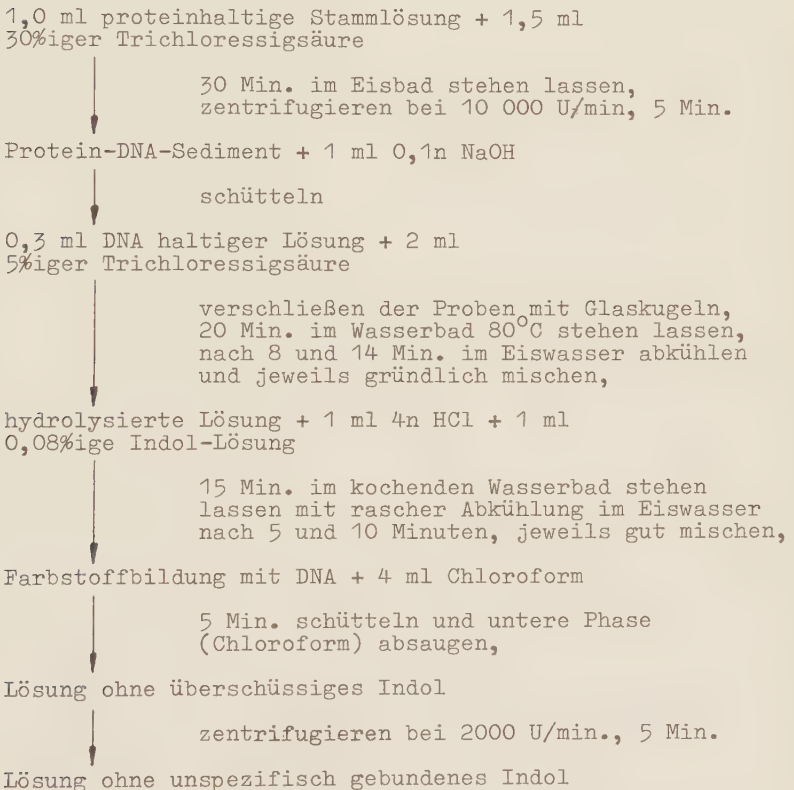
Ablesen der Extinktion im Photometer bei 750 nm.

Die Proteinbestimmung erfolgte anhand einer Eichkurve.

2. 6. DNA-Bestimmung

Der DNA-Gehalt des zu untersuchenden Tumorgewebes wurde nur bei den Tumoren der zweiten Versuchsserie ermittelt.

Für die DNA-Bestimmung bedienen wir uns der Methode von Hubbard et al. (1970):



Die Messung der Farbstoff haltigen Proben erfolgte im Photo-
meter bei 490 nm gegen einen Nullwert. Der DNA-Gehalt wurde
mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt. Die Eichkurvenproben ent-
hielten 1mg/ml Calf-Thymus-DNA (Typ I, hoch polymerisiert,

Sigma Chemical Company, St. Louis) in verschiedenen Konzentrationen.

Ein aliquoter Teil der isolierten DNA haltigen Lösungen wurde in 10 ml Insta-Gel-Szintillator (Fa. Packard) aufgenommen und die Einbauratenmessung im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Packard Tri-Carb 3320) durchgeführt.

Den aufgetretenen Färbungsquench glichen wir mittels einer von uns aufgestellten Quenchkurve aus.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurde an 49 Tumorstückchen, die von Hetero-Transplantaten der drei menschlichen Oropharynx-Geschwülste stammten, der ^3H -Thymidineinbau mittels der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie und der Autoradiographie untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tab. 1 und 2 zusammengefaßt und in Abb. 3 bis 7 graphisch dargestellt.

Aus Abb. 2 geht die lineare Abhängigkeit der cpm/ml vom Trockengewicht, dem Protein bzw. dem DNA-Gehalt pro ml hervor. Außerdem wird deutlich, daß diese lineare Abhängigkeit für alle drei Bezugsgrößen in gleicher Weise gilt.

Innerhalb eines Transplantat-Tumors schwankt der Markierungsindex durchschnittlich um 10 bis 15 %. Gelegentlich bestehen aber auch größere Unterschiede des Markierungsindex der einzelnen Teile einer Geschwulst, wie beispielsweise in Versuch 4 der Tab. 1.

Wesentlich stärker differieren die auf mg Protein bezogenen Impulse der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie von Stückchen zu Stückchen ein und derselben Geschwulst. Unterschiede bis zu maximal 27,5 % - bei gleichem Markierungsindex - werden besonders in Tab. 2 Versuch 13 deutlich.

Vergleicht man die cpm/mg Protein mit dem dazu gehörigen Markierungsindex des gleichen Tumorstückchens, geht eine hohe Impulsrate in der Flüssigkeits-Szintillation keineswegs stets mit einem hohen Markierungsindex einher. Dies wird besonders in Tab. 2 bei Tumor III deutlich, dessen Markierungsindex in

allen Teilen der Transplantate relativ gleichförmig ist, dessen Impulsrate, bezogen auf mg Protein, jedoch zwischen 9235 und 24093 Cpm schwankt. Ein ähnliches Bild ergibt sich, bezieht man die Cpm-Werte auf mg Trockengewicht bzw. μg DNA. Tumor I und II verhalten sich ähnlich, vergleicht man die Cpm-Werte zu den Bezugsgrößen Trockengewicht, Protein und DNA mit den Markierungsindices des jeweils gleichen Tumorstückchens.

Bei den Versuchen 4, 7, 12, 13 und 14 (Tumor I und III) wurden zusätzlich Silberkornzählungen durchgeführt (Abb. 8 bis 11). Die Anzahl der Silberkörner über jeweils 100 zufällig ausgewählten markierten Zellen pro Tumorstückchen ergibt innerhalb eines Tumors völlig unterschiedliche Verteilungshistogramme. Dies wird besonders bei Tumor III deutlich (Tab. 2, Abb. 10 und 11).

Bei einem etwa gleichen Markierungsindex von 22,7 % bzw. 22,9 % beträgt die Impulsrate im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer 13067 Cpm/mg Protein bzw. 24093 Cpm/mg Protein (Tab. 2, Versuch 12 bzw. 13).

Die entsprechenden Histogramme der Kornzahldichte über den markierten Zellen enthalten im ersten Fall (Versuch 13, Abb. 11) überwiegend Zellen mit wenig Silberkörnern, im zweiten Fall (Versuch 12, Abb. 10) überwiegend Kerne mit hohen Silberkornzahlen.

Werden die Silberkornzählungen für die Tumoren I und III jeweils zusammengefasst und der Impulsrate des jeweils dazugehörigen Tumorstückchens gegenüber gestellt, erhält man Abb. 12.

Das Diagramm verdeutlicht, daß mit steigendem Anteil von Zellen mit vielen Silberkörnern die Impulsrate in der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie ebenfalls ansteigt.

4. Dikussion

Für die Untersuchung der Dynamik des Tumorwachstums stehen uns verschiedene zellkinetische Methoden zur Verfügung. Zu den gebräuchlichsten gehören die Autoradiographie und Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie. Beide Verfahren beruhen darauf, daß Gewebezellen während ihrer Entwicklung und als Voraussetzung ihrer methodischen Teilung die DNA verdoppeln müssen. Hierbei ist es prinzipiell gleichgültig, ob die dazu benötigten Grundsubstanzen wie Aminosäuren oder Zucker aus dem körpereigenen Reservoir synthetisiert oder von außen zugeführt werden. Injiziert man einem Versuchstier beispielsweise radioaktiv markiertes Thymidin (In vivo-Versuch) oder inkubiert man Gewebe in Gegenwart von Thymidinüberschuss (In vitro-Versuch), wird dieses exogen zugeführte Thymidin zur Verdopplung der DNA benutzt. Gleichzeitig wird das radioaktive Isotop von der Zelle mit aufgenommen.

Diesen Vorgang nennt man "radioaktive Markierung" der DNA bzw. der Zellen. Nach der Markierung ist die Zelle gewissermaßen zu einer Strahlenquelle geworden und kann mit geeigneten Labortechniken sichtbar gemacht werden.

Autoradiographie und Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie machen sich diese Tatsache zunutze und ermöglichen den quantitativen Nachweis derjenigen Zellen eines Gewebes, die zum Zeitpunkt des Versuches in die DNA-Synthesephase des Zellzyklus eingetreten sind und ihre DNA verdoppelt haben. Bei der Autoradiographie gelingt der Nachweis dadurch, daß histologische Schnitte eines markierten Gewebes mit einer

Fotoemulsion überschichtet und für einen bestimmten Zeitraum im Dunkeln exponiert werden. Während der Expositionszeit werden die Silberbromidkörner der Fotoemulsion infolge der vom Zellkern emittierten Strahlung über allen Zellen, die während des Versuches radioaktiv markiertes Thymidin eingebaut haben, "belichtet". Nach entsprechender Entwicklung der Fotoschicht werden sie als silbern-schwarze Punkte über der Zelle sichtbar.

Für die Untersuchung im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer werden die Zellen zerstört und in einem flüssigen, organischen Szintillator gelöst. Die markierten DNA-Bruchstücke geben ihre kinetische Energie an einen primären Szintillator ab, die dabei auftretenden Photonen werden von einem sekundären Szintillator absorbiert und als Licht größerer Wellenlänge emittiert. In einem Photomultiplier werden die Photonen in Impulse umgesetzt und mit Hilfe einer elektronischen Schaltung als Impulsrate (counts per minute = cpm) ausgedruckt.

Die Schwierigkeit bei den Untersuchungsverfahren liegt in der Vermeidung der zahlreichen technischen und methodischen Fehler. Im folgenden sollen deswegen zunächst die Methoden und im Anschluß daran die mit ihrer Hilfe gewonnenen Resultate diskutiert werden.

4. 1. Diskussion der Methodik

Weil für die vorliegende Untersuchung sehr viel mehr Tumorgewebe benötigt wurde, als es mit einer einzigen Probeexcision aus dem menschlichen Tumor zur Verfügung stand, wurde das Biopsiematerial auf thymusaplastische nu/nu Mäuse transplantiert. Dieser haarlosen Mäusemutante des Stammes Balb C fehlen aufgrund eines Gendefektes die T-Lymphocyten weitgehend. Deswegen ist die thymusaplastische Maus ein besonders gut geeignetes Empfängertier für heterologe Transplantate. Selbst nach wiederholten Tierpassagen ändern sich weder das histologische Bild noch das biologische Verhalten der Transplantate im Vergleich zum menschlichen Originaltumor (Povlsen et al. 1974, 1975; Krause et al. 1975; Epstein et al. 1976; Bastert et al. 1977; Lindenberger et al. 1977, 1978). Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch nekrotisches Tumorgewebe zu vermeiden, wurden nur Transplantattumoren, deren Volumennicht mehr als 0,75 qcm betrug, untersucht. Außerdem erfolgte die Pulsmarkierung der Mäuse mit ^3H -Thymidin stets zwischen 9,30 und 11,00 Uhr, um tageszeitlich bedingte Einbauschwankungen des DNA-Bausteins zu vermeiden (Pilgrim et al. 1965).

Zur Markierung der Tumorzell-DNA verwendeten wir radioaktiv markiertes Thymidin, das nahezu ausschließlich in die DNA eingebaut wird (Fridland 1973). Bevorzugtes Isotop für die Markierung des Thymidin ist der β -Strahler Tritium (^3H), weil er im Autoradiogramm ein besonders gutes Auflösungsvermögen zeigt (Feinendegen 1971).

Wichtig ist, daß das ^3H -Thymidin im Überschuß angeboten wird, damit tatsächlich alle Zellen, die während der Versuchsdauer ihre DNA verdoppeln, markiert werden. Eine zu niedrige Konzentration des exogen zugeführten Thymidin würde die Reutilisation körpereigenen unmarkierten Thymidins nicht verhindern und zu einer Verfälschung des Markierungsindex führen. Die in dieser Untersuchung verwendete Menge und die spezifische Aktivität des benutzten ^3H -Thymidin sind ausreichend, um den Einbau körpereigenen Thymidins sicher zu vermeiden.

Die Transplantattumoren wurden eine Stunde nach der Pulsmarkierung des Tieres exstirpiert und verarbeitet. Das Zeitintervall von einer Stunde wurde deswegen gewählt, weil exogen zugeführtes Thymidin im Organismus innerhalb 30 bis 40 Minuten in Abhängigkeit von der katabolischen Leberaktivität des Versuchstieres in die Zellen eingebaut wird (Maurer und Koburg 1961; Oehlert et al. 1963; Hughes et al. 1964; Rajewsky 1966; Lederer 1970; Fridland 1973).

Eine Stunde nach der Injektion ist das zugeführte Thymidin also mit Sicherheit in die Zellkern-DNA integriert.

Die vom Tritium ausgesandte β -Strahlung hat eine extrem kurze Reichweite, die darüber hinaus von der Strukturdichte des Gewebes abhängig ist. Diese sogenannte β -Selbstabsorption kann dazu führen, daß sich in der über dem histologischen Präparat liegenden Fotoemulsion keine Silberkörner schwärzen. Nach Untersuchungen von Maurer und Primbsch (1964) spielt die unterschiedliche Strukturdichte verschiedener Gewebe unterhalb einer bestimmten Dicke des histologischen Schnittes keine

Rolle mehr. Diese Schnittdicke, innerhalb derer die Silberkorndichte in der Fotoemulsion auf einen Plateauwert ansteigt, beträgt etwa $5\mu\text{m}$. In der vorliegenden Untersuchung gelangten deswegen nur histologische Schnitte mit dieser Dicke zur Auswertung.

Die Anzahl der durch die β -Strahlung geschwärzten Körner in der Fotoschicht steigt exponentiell mit der Entwicklungszeit der Präparate bis zu einem Plateauwert an. Wartet man mit der Entwicklung der Präparate noch länger, nimmt die Zahl der Silberkörner nicht zu; es kommt aber vermehrt zum Auftreten der sogenannten Koinzidenz, d.h. ein und dasselbe Silberkorn entsteht durch Auftreffen mehrerer Zerfallsteilchen (Doermer 1967). Hierdurch wird die Auswertbarkeit der Präparate erschwert. In Vorversuchen ermittelten wir die günstigste Expositionszeit für unsere Präparate. Sie betrug 3 bis 4 Wochen. Die bei noch längerer Expositionszeit zusätzlich auftretende Konfluenz und Konglomeration von Silberkörnern erschwert die Auswertung der Präparate, soweit Silberkörner über einzelnen markierten Zellen gezählt werden sollen, zusätzlich.

Die angeschnittenen Probleme verdeutlichen, wie schwierig es ist, autoradiographische Untersuchungen in reproduzierbarer Form durchzuführen und zu standardisieren. Denn neben der β -Selbstabsorption und der Koinzidenz sind beispielsweise gleichbleibende Empfindlichkeit der Fotoemulsion oder eine gleichbleibende Energie des β -Strahlers notwendig. Erschwerend kommt hinzu, daß bei dieser Methode natürlich nicht alle Zellen des Gewebes ausgezählt werden können. Man muß sich stets auf eine zufällige, stichprobenartige Auswahl von Objektträgern beschränken.

Deswegen ist von vornherein mit einem bestimmten methodischen Fehler zu rechnen. Dieser Fehler liegt auch bei genauester Durchführung der Untersuchung und bei großer Übung im Auswerten der Präparate in einer Größenordnung von 10 bis 15 %. Die Beurteilung autoradiographischer Ergebnisse muß deswegen stets unter Berücksichtigung dieses Fehlers erfolgen.

Etwas anders verhält es sich mit der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie. Bei diesem Untersuchungsverfahren läßt sich der subjektive Fehler vernachlässigbar klein halten. Dafür können bereits kleinste Fehler in der Aufarbeitung des Materials, wie beispielsweise Meßfehler beim Wiegen oder Temperaturschwankungen bei der DNA-Extraktion, das Endergebnis nachhaltig verfälschen.

Bedingt durch Farbstoffbildung (Indolreaktion bei der DNA-Bestimmung) oder ungünstigen Konzentrationsverhältnissen zwischen ungünstigem Volumen und Szintillator kann ein Energieverlust auftreten, der durch eine von uns aufgestellte Quenchkurve ausgeglichen wurde. Der Färbungsquench, der bei der Ermittlung der Einbauraten in DNA bei allen Proben proportional mit zunehmender DNA-Konzentration auftrat, konnte dann anhand der Quenchkurve auf den maximalen Wirkungsgrad umgerechnet werden. Diese Extrapolation ist wohl auch der Grund dafür, daß die Einbauraten in DNA größeren Schwankungen unterliegen, als die auf Protein bezogenen.

Alle untersuchten Proben für Protein wurden vor der Flüssigkeits-Szintillations-Messung neutralisiert und wiesen deswegen den maximalen Wirkungsgrad auf, der bei dem von uns verwendeten Gerät 35,8 % betrug.

Das übliche Vorgehen, nämlich Papierfilter als Träger der strahlenden Substanz zu verwenden (Mans et al. 1961; Volm et al. 1968, 1970, 1974; Kummer 1971; Rajewsky et al. 1971; Fridland 1973; Bastert et al. 1975, 1976) wurde von uns durch die Messung der Impulsrate direkt in Flüssigkeit ersetzt. In Vorversuchen hatten wir nämlich festgestellt, daß die Papierfilter etwa 10 % der ausgesandten Strahlung absorbieren.

Die übrigen methodischen Schritte bei der Präparation des Tumorgewebes, insbesondere der Extraktion von DNA wurden entsprechend den Empfehlungen von Hubbard et al. (1970) unter Verwendung geeichter Pipetten und automatisch gesteuerter Wasserbäder durchgeführt.

Der Proteingehalt in den Gewebeproben wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

Unter Voraussetzung der dargestellten technischen Fehlerfreiheit ist die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie jedoch ebenfalls mit einem nicht beeinflussbaren methodischen Fehler behaftet. Während dieser bei der Autoradiographie auf der zwar zufälligen, jedoch subjektiven Auswahl der histologischen Präparate und dem Zählfehler beruht, entsteht er bei der Flüssigkeits-Szintillation dadurch, daß die Impulse aller Zellen des Gewebes gemessen werden. Es besteht nicht, wie bei der Autoradiographie, die Möglichkeit, lediglich die Tumorzellen in die **Bewertung** mit einzubeziehen.

Bei der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie kann also nicht gesagt werden, ob die Impulsrate von Tumorzellen allein oder von einem Gemisch aus Tumor- und Normalzellen stammt.

Der Fehler kann besonders dann eine Rolle spielen, wenn Probe-excisionen aus verschiedenen Tumoren unmittelbar verarbeitet und miteinander verglichen werden. Durch die zwischenzeitliche Heterotransplantation der Biopsie auf thymusaplastische Mäuse wird dieser Fehler erheblich verkleinert. Denn die Mäusepassage bewirkt unter Beibehaltung der biologischen Eigenschaften des Tumors eine erhebliche Reduktion des Bindegewebes beispielsweise (Lindenberger et al. 1978).

4. 2. Diskussion der Ergebnisse

Möglichst genaue Kenntnisse über das Wachstumsverhalten bösartiger Geschwülste sind die Voraussetzung für eine optimale Tumorbehandlung, beispielsweise durch Cytostatika. Der Kliniker kann die hierfür zur Verfügung stehenden experimentellen Techniken jedoch nur selten einsetzen, da sie - abgesehen von den methodischen Fehlern - zu zeitaufwendig sind.

Selbst die vergleichsweise einfache Untersuchung der Proliferationsaktivität eines Gewebes mit Hilfe der Autoradiographie erfordert mindestens vier bis sechs Wochen, bis das Ergebnis vorliegt. Die wesentlich weniger zeitaufwendige Cytophotometrie weist andere Nachteile auf (Martin 1978). Das dritte Verfahren, mit dem sich die DNA-synthetisierende Zelle erkennen und anhand dieser sich die Proliferationsaktivität relativ genau bestimmen läßt, ist die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie.

Beim Studium der Literatur fällt allerdings auf, daß die veröffentlichten Resultate teilweise widersprüchlich sind, daß sie sich nur schlecht mit autoradiographisch gewonnenen Ergebnissen vergleichen lassen und daß sie in der Regel nicht unter vergleichbaren methodischen Bedingungen an menschlichen Plattenepithelcarcinomen gewonnen wurden. Somit ist bisher die Frage, ob sich die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie tatsächlich mit Gewinn in der klinischen Tumorbehandlung einsetzen läßt, weitgehend offen geblieben. Deswegen haben wir an menschlichen Oropharynx-Carcinomen nach Heterotransplantation der Biopsien sowohl autoradiographisch als auch spektrometrisch den DNA-Gehalt des Tumorgewebes bestimmt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Wie aus Abschnitt 3 hervorgeht, stehen den unter Berücksichtigung des methodischen Fehlers mehr oder minder gleichförmigen Markierungsindices der einzelnen untersuchten Tumorstückchen stark voneinander abweichende Impulsraten gegenüber. Hieraus läßt sich zunächst der Schluß ziehen, daß die Heterotransplantate einer Geschwulst eine sehr ähnliche Proliferationsaktivität aufweisen, untersucht man sie autoradiographisch.

Nach Zuhilfenahme der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie trifft dieses Ergebnis jedoch nicht mehr zu. Die unterschiedlich hohen Impulsraten deuten im Gegenteil darauf hin, daß in den einzelnen Heterotransplantaten eines Tumors unterschiedlich viele Zellen in die DNA-Synthesephase eintreten, die Proliferationsaktivität somit vollständig unterschiedlich sein kann.

Worauf läßt sich diese Diskrepanz der Befunde zurückführen ?

Das Problem der Anzahl von DNA-synthetisierenden Zellen in verschiedenen Teilen eines Tumors bzw. seiner Transplantate auf thymusaplastische Mäuse ist bereits mehrfach untersucht worden, zuletzt von Ganzer und Martin (1978) und von Nensa (1979 - Literaturübersicht). Man kann davon ausgehen, daß die Verteilung DNA-synthetisierender Zellen in den nicht nekrotischen Randbezirken menschlicher Carcinome des Oropharynx innerhalb eines Tumors mit der Einschränkung durch den methodischen Fehler etwa gleich groß ist und sich wesentliche Proliferationsunterschiede zwischen den Heterotransplantaten nicht nachweisen lassen. Demnach müßte die Diskrepanz in den Ergebnissen auf der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie selbst beruhen. Dies ist tatsächlich der Fall und findet seine Erklärung, wenn man:

- a) die Vorgänge der DNA-Synthese näher betrachtet und
- b) sich vor Augen führt, was mit der Flüssigkeits- Szintillations-Spektrometrie tatsächlich gemessen wird.

Zu a) Die DNA besteht aus Phosphat, Desoxyribose und vier Basen, den Pyrimidinen Thymin und Cytosin sowie den Purinen Adenin und Guanin. Jeweils eine der Basen ist an einen Phosphatzucker gebunden und bildet mit diesem zusammen ein Desoxyribonucleotid. Diese Nucleotide sind in Form zweier Stränge, die sich in definiertem Winkel und mit definierter Steigung spiralig umeinander winden, angeordnet. Die Basensequenz des einen Stranges ist vorgegeben, die des anderen dadurch festgelegt, daß sich nur Thymin und Adenin bzw. Cytosin und Guanin, durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden, gegenüber stehen können.

Vor der mitotischen Zellteilung verdoppelt sich die DNA in der S-Phase des Zellzyklus nach Entspiralisierung auf dem Wege der semikonservativen Replikation. In Gegenwart einer DNA-Polymerase bildet sich an jedem Elternstrang eine komplementäre Folge aus Desoxyribonucleotiden, so daß zwei Doppelhelices entstehen, von denen eine am Ort bleibt, die andere der Tochterzelle in der Mitose mitgegeben wird.

Der Vorgang der DNA-Reduplikation benötigt Zeit und hat demzufolge eine bestimmte Länge der DNA-Synthesephase, die von Tumor zu Tumor unterschiedlich sein kann, zur Folge. Wenn eine Tumorzelle genau zum Zeitpunkt der in vivo-Markierung des Versuchstieres in die S-Phase eintritt, wird sie während der gesamten Zeit, in der das exogen zugeführte ^3H -Thymidin verfügbar ist, dieses zur DNA-

Verdopplung benutzen. Beginnt die Zelle jedoch erst kurz vor dem Ende der Verfügbarkeit des exogenen Thymidins mit der DNA-Synthese, steht ihr entsprechend weniger markiertes Thymidin für die Reduplikation zur Verfügung.

Ebenso verhält es sich mit einer Zelle, die kurz nach dem Beginn der Markierung die DNA-Synthesephase bereits verläßt, weil die Reduplikation beendet ist.

Während der Versuchsdauer werden demnach zwar alle Zellen, die ihre DNA verdoppeln, markiertes Thymidin einbauen, jedoch in unterschiedlicher Menge. Weil Tumorzellen üblicherweise polyploid sind, d.h. von vornherein unterschiedliche Mengen an DNA enthalten, unterliegt der Einbau des markierten Thymidins auch von dieser Seite her experimentell nicht erkennbaren und nicht beeinflussbaren Schwankungen.

Alle markierten Zellen, gleichgültig ob sie viel oder wenig Tritium eingebaut haben, schwärzen die Fotoemulsion. Weil bei vorgegebener Expositionszeit die Anzahl der geschwärzten Silberkörner über dem Zellkern jedoch abhängig ist von der Zahl der radioaktiven Impulse, die aus der DNA dieses Zellkernes stammen, findet man bei der Auswertung Zellen mit unterschiedlich vielen Silberkörnern in der Emulsion als Ausdruck der unterschiedlichen Menge des eingebauten ^3H -Thymidins. Von einer gewissen Mindestkornzahl an, die vom Background und damit von der Qualität der Präparate abhängig ist, wird jede Zelle mit einer Markierung als DNA-Zelle bewertet und in die Berechnung des Markierungsindex mit einbezogen.

Die Autoradiographie ist also letztlich eine morphologische Methode, die das statische Bild der Verteilung von S-Phasezellen innerhalb des untersuchten Gewebes wiedergibt.

Zu b) In das Ergebnis der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie geht aber nicht nur die Anzahl der Zellen, die sich einer DNA-Reduplikation unterziehen, sondern auch die Menge des während der Versuchsdauer eingebauten ^3H -Thymidins ein.

Weil das Gewebe für die Auswertung homogenisiert werden muß, ist eine Unterscheidung zwischen stark markierten Zellen, also denen, die viel exogenes Thymidin eingebaut haben, und schwach markierten Zellen, die wenig Thymidin inkorporiert haben, nicht möglich.

Die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie gibt uns also nur einen sehr vagen Hinweis auf den Anteil der DNA-synthetisierenden Zellen im untersuchten Gewebe. Im Wesentlichen läßt sich mit ihr direkt der DNA-Umsatz bzw. die DNA-Syntheserate des Gewebes bestimmen.

Die Richtigkeit dieser Überlegung wird durch Abb. 12 bestätigt. Je mehr Zellen mit vielen Silberkörnern in einem Tumorstück vorhanden sind, umso höher fällt die spektrometrisch gemessene Impulsrate aus. Enthält das Tumorstückchen viele Zellen mit wenig darüber liegenden Silberkörnern, ist der ausgedruckte Cpm-Wert entsprechend kleiner.

Aus dem unter a) und b) Gesagten kann gefolgert werden, daß zwei Tumorstückchen, die genau die gleiche Anzahl von DNA-synthetisierenden Zellen enthalten, hinsichtlich des autoradiographisch gewonnenen Markierungsindex eine völlige Übereinstimmung zeigen, hinsichtlich der Impulsrate in der Flüssigkeits-Szintillation jedoch stark voneinander abweichende Ergebnisse aufweisen können.

Die Differenz der Impulsraten beruht hauptsächlich auf dem verschieden großen Einbau des exogen zugeführten ^3H -Thymidins. Die Autoradiographie gibt den Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen numerisch und quantitativ wider, stellt hinsichtlich der DNA-Syntheseleistung der Zelle jedoch lediglich ein qualitatives Untersuchungsverfahren dar. Die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie hingegen gibt uns keine direkte Auskunft über den numerischen Anteil der S-Phasezellen. Sie ist jedoch eine quantitativ sehr genaue Methode, um den DNA-Umsatz des gesamten untersuchten Gewebes während der Versuchsdauer widerzuspiegeln.

Darüber hinaus ist zu bedenken, daß wiederholte alleinige spektrographische Untersuchungen des DNA-Umsatzes am gleichen Gewebe ebenfalls verschiedene Ergebnisse liefern können. Denn die Aufnahme exogen zugeführten ^3H -Thymidins ist nicht nur, wie bereits geschildert, von der Verweildauer der Zelle in der DNA-Synthesephase abhängig, sondern ebenso auch von dem Angebot an Thymidin. Dieses Angebot wird in Gebieten großer Durchblutung höher sein als in Tumorealen mit geringer Gefäßversorgung. Im Autoradiogramm würde sich die unterschiedliche Gefäßversorgung in einer verschieden großen Anzahl geschwärzter Silberkörner über dem Zellkern ausdrücken, wobei die absolute Zahl markierter

Zellen etwa die gleiche sein kann. In der Flüssigkeits-Szintillation findet die wechselnde Gefäßversorgung verschiedener Tumorbezirke in einer sehr unterschiedlichen Impulsrate ihren Ausdruck.

Schließlich muß man berücksichtigen, daß im Gegensatz zur Autoradiographie, bei der nur intakte Tumorzellkerne gezählt werden, in das Ergebnis der Flüssigkeits-Szintillation auch die nekrotischen Anteile des Tumors mit eingehen, weil in den Nekrosen kein ^3H -Thymidin eingebaut werden kann, muß die Impulsrate (Cpm) um so niedriger werden, desto höher der Nekroseanteil ist.

Vergegenwärtigt man sich die prinzipiellen Unterschiede der beiden Methoden, ist es einleuchtend, daß sich zellkinetische Resultate, die mit der einen oder anderen Methode gewonnen worden sind, nicht vergleichen lassen. Hierauf haben Lindner et al. bereits 1968 hingewiesen. Unsere Resultate und deren Interpretation verdeutlichen ferner, daß sich die Autoradiographie nicht durch die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie ersetzen läßt - zumindest nicht bei vergleichenden Untersuchungen der Proliferationsaktivität unbehandelter Gewebe. Die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie ist vermutlich dann vor Vorteil, wenn an einem Tumor nach Vorbehandlung mit einem Cytostatikum mit wiederholten Probeentnahmen über einen bestimmten Zeiteabschnitt der DNA-Umsatz als indirekter Ausdruck für die Proliferationsaktivität untersucht werden soll.

Es ist jedoch vorstellbar, daß die diskutierte große Streuung der Impulsraten Signifikantsberechnungen erschweren könnten.

5. Schlußfolgerungen

Unter Berücksichtigung der experimentellen Befunde und der diskutierten Probleme lassen sich die einleitend gestellten Fragen folgendermaßen beantworten:

1. Nach Markierung von Heterotransplantaten menschlicher Oropharynx-Geschwülste mit ^3H -Thymidin läßt sich eine Korrelation zwischen den Einbauraten des Tritium im DNA-, Protein- oder Trockengewicht bei der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie einerseits und dem Markierungsindex der Autoradiographie andererseits nicht nachweisen.

Während die Autoradiographie als morphologische Methode quantitativ den Anteil an Zellen, die sich während der Versuchsdauer in der DNA-Synthesephase befunden haben wiedergibt, wird mit der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie quantitativ die DNA-Einbaurate in alle Zellen gemessen.

2. Der an unbehandelten Tumoren autoradiographisch gewonnene Markierungsindex als Ausdruck der Proliferationsaktivität kann deswegen mit den Resultaten der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie nicht verglichen werden.

In wie weit aber diese empfindliche Methode zur Bestimmung des DNA-Umsatzes für die Lösung zellkinetischer Probleme hilfreich sein könnte, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

6. Zusammenfassung

Wir wollten mit dieser Arbeit die Fragen beantworten, ob sich die Ergebnisse, die mittels der Autoradiographie gewonnen werden, mit denen, durch die Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie ermittelten Ergebnisse, vergleichen lassen und ob die Proliferationsaktivität mit Hilfe der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie bestimmt werden kann.

Untersucht wurden drei menschliche, unbehandelte Plattenepithel-Carcinome des Oropharynx. Zur Gewinnung einer größeren Tumormenge wurden Probeexcisionen in die Milchleistenregion thymusaplastischer nackter Mäuse transplantiert. Einige Wochen später wurden die Mäuse mit ^3H -Thymidin markiert und nach einer Stunde die Heterotransplantate exstirpiert und jedes in zwei bis vier annähernd gleich große Stücke zerteilt. Von jedem Tumorstück wurde die ^3H -Thymidin-Einbaurate in Protein bestimmt. Bei den Tumoren der 2. Versuchsserie bezogen wir die Cpm-Werte auf den DNA- und Protein-Gehalt sowie auf das Trockengewicht der Tumorstückchen. Von allen untersuchten Tumorgeweben wurden parallel dazu für Histologie und Autoradiographie Proben entnommen. Der Markierungsindex wurde auf 10000 Zellen ermittelt.

Wir fanden, daß bei ein und derselben Geschwulst der autoradiographisch ermittelte Markierungsindex geringeren Schwankungen unterliegt als die Cpm-Werte der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie.

Die bei zwei Tumoren durchgeführten Silberkornzählungen zeigten, daß mit der Zunahme von Silberkörnern über den Zellen

die Impulsrate in der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie ebenfalls ansteigt.

Weiterhin muß berücksichtigt werden, daß mit zunehmendem Nekroseanteil die Impulsrate (Cpm) niedriger werden kann.

Die Resultate zeigen, daß nach Pulsmarkierung der untersuchten Tumorgewebe mit ^3H -Thymidin keine ausreichend große Korrelation zwischen dem autoradiographisch ermittelten Markierungsindex und den Cpm-Werten der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie besteht.

Aufgrund der unterschiedlich hohen Impulsraten innerhalb einer Geschwulst - bedingt durch verschieden großen Einbau des exogen zugeführten ^3H -Thymidins - läßt sich die Proliferationsaktivität am nicht vorbehandelten Tumorgewebe mit Hilfe der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie nicht erfassen.

Versuch (V.)	Seite der Maus	Tumor- teil	Flüss.-Szintill.-Spektr.			Autoradiogr. Mark.-Index (%)
			$\frac{\text{Cpm}}{\text{mg TG}}$	$\frac{\text{Cpm}}{\text{mg Pr.}}$	$\frac{\text{Cpm}}{\mu\text{g DNA}}$	
Tumor II	re	1	-	5 470	-	13,2
		2	-	4 877	-	14,0
		3	-	5 651	-	17,8
		4	-	5 457	-	16,0
	li	1	-	7 543	-	21,1
		2	-	6 141	-	22,3
		3	-	6 048	-	21,9
		4	-	5 431	-	16,6
	re	1	-	4 969	-	21,5
		2	-	5 959	-	19,6
		3	-	6 833	-	19,6
		4	-	4 489	-	15,8
	li	1	-	6 002	-	17,9
		2	-	7 739	-	19,8
		3	-	7 773	-	19,8
		4	-	4 716	-	17,2
Tumor I	re	1	-	4 950	-	13,5
		2	-	3 506	-	14,9
		3	-	3 951	-	13,9
		4	-	5 059	-	15,1
	li	1	-	5 457	-	18,4
		2	-	5 030	-	18,5
		3	-	5 013	-	17,8
		4	-	4 944	-	17,4
	re	1	-	5 213	-	20,0
		2	-	6 004	-	23,8
		3	-	4 770	-	18,3
		4	-	4 418	-	18,4
	li	1	-	3 317	-	20,8
		2	-	4 191	-	17,9
		3	-	6 131	-	18,3
		4	-	4 738	-	15,9
	re	1	-	5 112	-	21,0
		2	-	9 389	-	20,4
		3	-	8 020	-	16,8
		4	-	10 074	-	18,0
	li	1	-	6 705	-	18,8
		2	-	6 664	-	13,5
		3	-	7 091	-	16,0
		4	-	6 646	-	14,9

Tab. 1 Ergebnisse der 1. Versuchsserie

TG = Trockengewicht ; Pr. = Protein

Versuch (V.)	Seite der Maus	Tumor- teil	Flüss.-Szintill.-Spektr.			Autoradiogr. Mark.-Index (%)
			Cpm mg TG	Cpm mg Pr.	Cpm µg DNA	
Tumor II	6	re 1	7 887	13 431	84,19	18,0
		2	7 521	13 000	71,32	15,3
	7	re 1	11 100	14 536	83,95	14,7
		2	11 065	16 136	103,94	22,2
	8	re 1	12 105	17 763	128,13	19,7
		2	11 413	17 253	147,20	16,7
		li 1	13 469	18 082	141,04	16,4
		2	10 324	15 941	107,50	-
	9	li 1	6 060	10 517	88,15	18,3
		2	5 074	10 024	87,30	17,7
Tumor I	10	re 1	9 995	11 047	70,02	14,9
		2	6 364	9 459	79,68	12,3
	li	1	8 409	9 250	-	14,5
		2	7 522	10 155	70,49	12,8
Tumor III	11	re 1	11 611	16 207	85,55	24,1
		2	10 575	18 661	89,68	26,5
	12	re 1	13 570	20 431	95,52	24,2
		2	10 344	18 237	96,75	22,3
		li 1	13 238	24 093	126,19	22,9
		2	10 947	19 558	96,93	20,4
		3	11 281	21 718	116,05	24,0
	13	re 1	10 680	15 427	89,70	20,1
		2	8 970	14 626	80,70	21,1
	li	1	5 840	9 478	54,25	22,2
		2	8 453	13 067	68,10	22,7
	14	re 1	5 371	9 235	47,73	22,9
		2	8 072	12 000	62,61	26,9
		li 1	7 282	12 310	66,97	23,0
		2	10 540	17 257	103,87	22,7

Tab. 2 Ergebnisse der 2. Versuchsserie

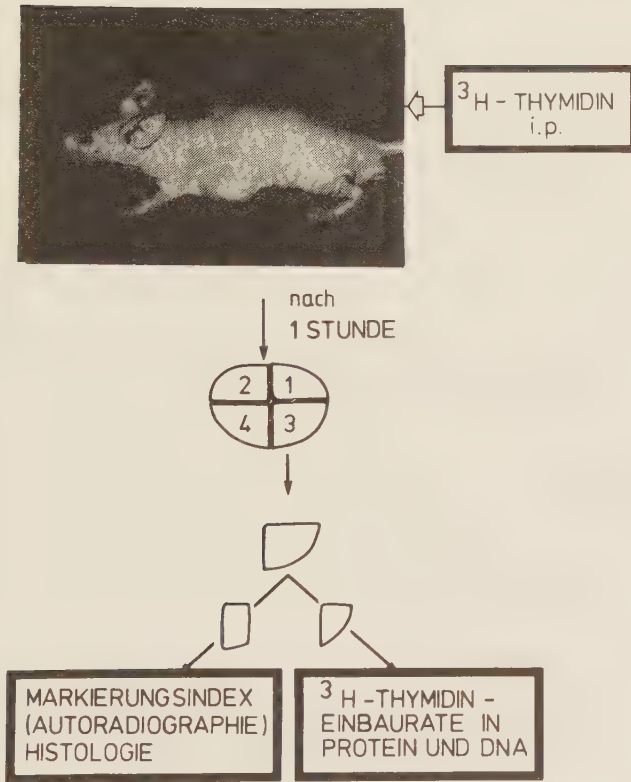


Abb. 1 Versuchsanordnung

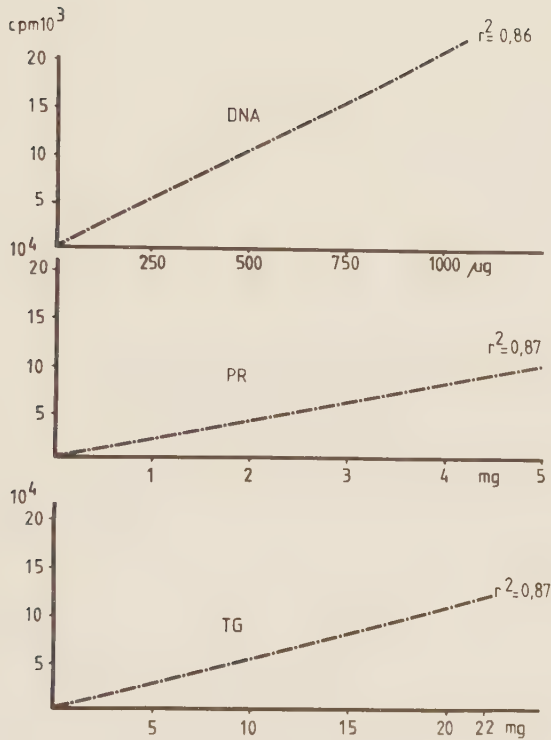


Abb. 2 Beziehung zwischen der Einbaurrate von ^3H -Thymidin (Cpm) und der Menge an Trockengewicht (TG), Protein (PR) sowie DNA pro ml Gewebe. Mit steigendem Trockengewicht sowie Protein- und DNA-Gehalt der Gewebe nimmt die Einbaurrate proportional zu.

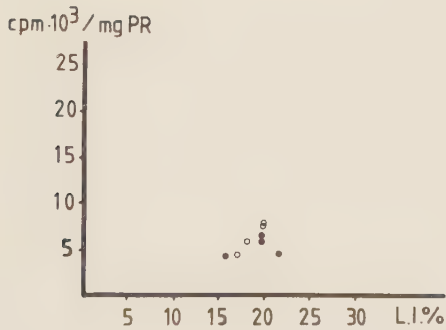
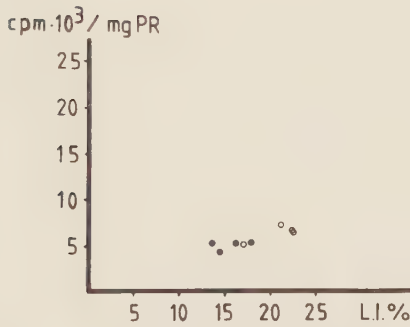


Abb. 3 ^3H -Thymidin-Einbaurrate (cpm) bezogen auf mg Protein (PR) sowie der Markierungsindex (L.I.%) in jeweils einem Tumorteil (Tumor II aus Tab. 1).

oben : V. 1 re ● ; li ○

unten: V. 2 re ● ; li ○

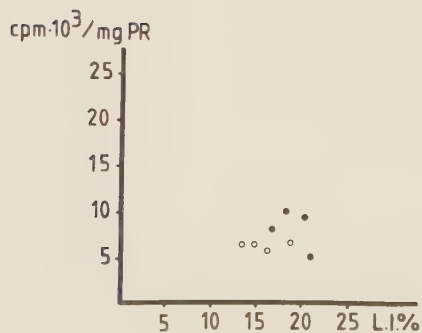
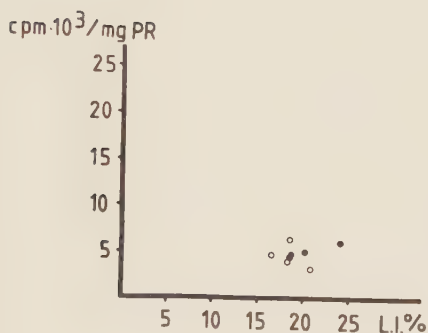
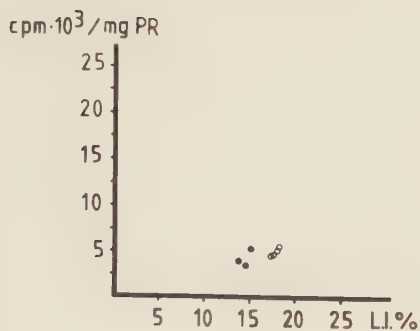


Abb. 4 ^3H -Thymidin-Einbaurrate (cpm) bezogen auf mg Protein (PR) sowie der Markierungsindex (L.I. %) in jeweils einem Tumorteil (Tumor I aus Tab. 1)

oben : V. 3 re ● ; li ○

mitte : V. 4 re ● ; li ○

unten : V. 5 re ● ; li ○

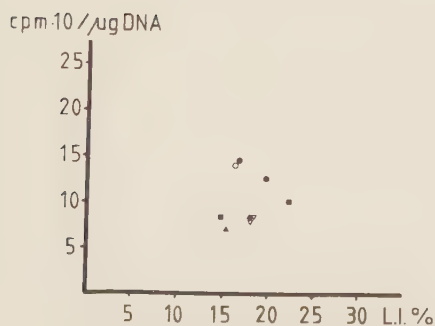
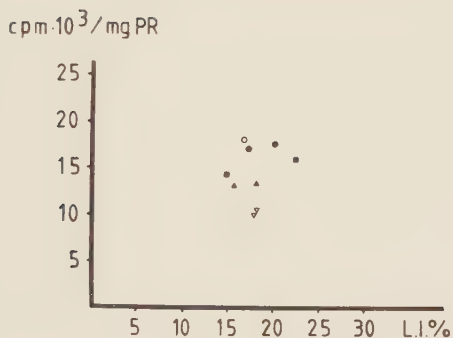
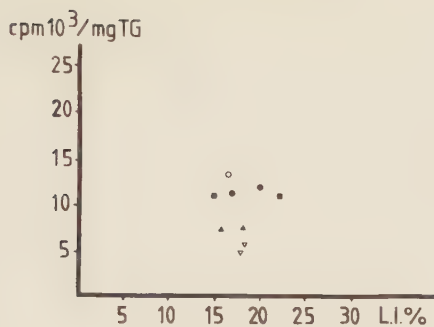


Abb. 5 ^3H -Thymidin-Einbauraten (cpm) bezogen auf mg Trockengewicht (TG), mg Protein (PR) und μg DNA sowie der Markierungsindex (L.I. %) in jeweils einem Tumorteil (Tumor II, Tab.2).

V. 6 re ▲

V. 7 re ■

V. 8 re ● ; li ○

V. 9 li ▼

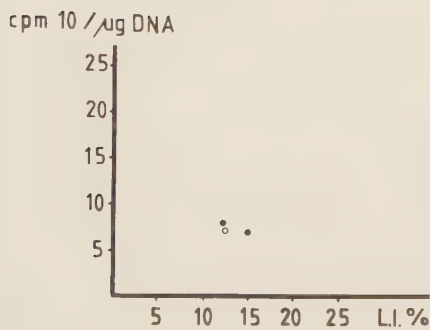
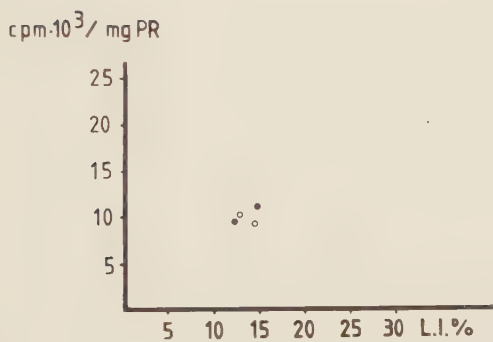
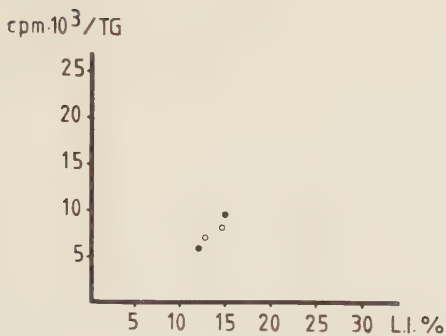


Abb. 6 ^3H -Thymidin-Einbaurrate (cpm) bezogen auf mg Trockengewicht (TG), mg Protein (PR) und μg DNA sowie der Markierungsindex (L.I. %) in jeweils einem Tumorteil (Tumor I, Tab. 2).

V. 10 re ● ; li ○

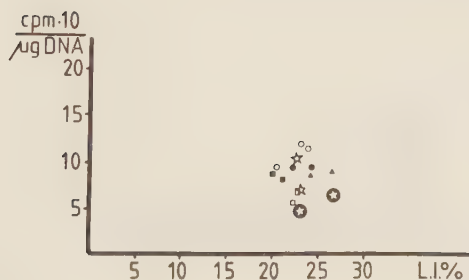
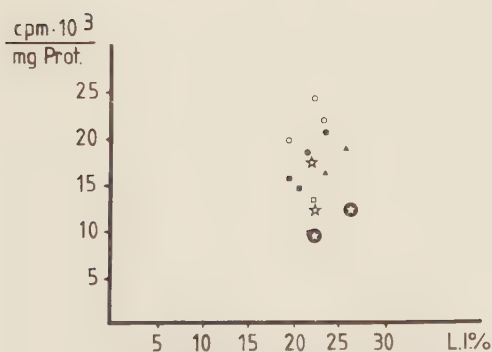
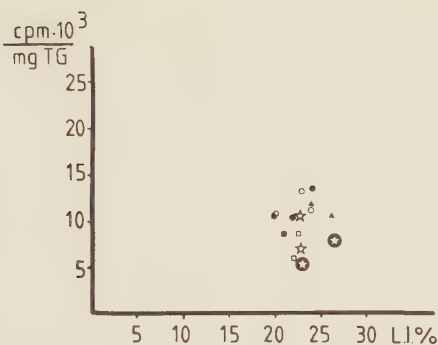


Abb. 7 ^3H -Thymidin-Einbaurrate (cpm) bezogen auf mg Trockengewicht (TG), mg Protein (PR) und µg DNA sowie der Markierungsindex (L.I. %) in jeweils einem Tumorteil (Tumor III, Tab.2).

- V. 11 re ▲ ;
 V. 12 re ● ; li ○
 V. 13 re ■ ; li □
 V. 14 re ⊗ ; li ☆

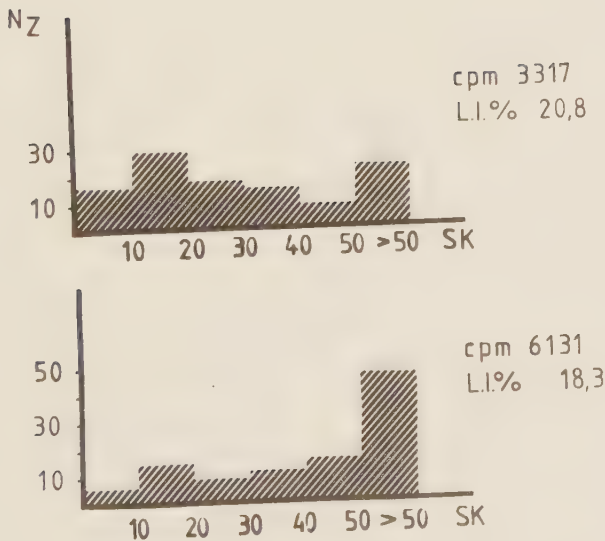


Abb. 8 Verteilung der Silberkornzahl (SK) pro Zellkern von 100 zufällig ausgewählten Zellen im Autoradiogramm mit Gegenüberstellung von Einbaurrate (cpm/mg Protein) und Markierungsindex (L.I. %) desselben Gewebes (Tumor I, Tab.1).

oben : V. 4 - li 1

unten: V. 4 - li 3

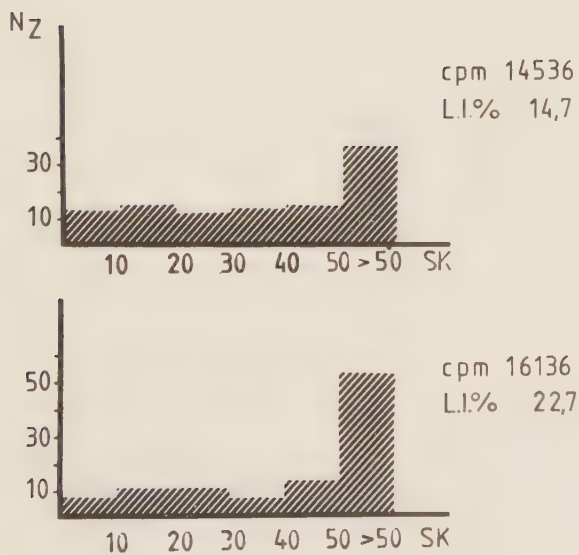


Abb. 9 Verteilung der Silberkornzahl (SK) pro Zellkern von 100 zufällig ausgewählten Zellen im Autoradiogramm mit Gegenüberstellung von Einbaurrate (cpm/mg Protein) und Markierungsindex (L.I. %) desselben Gewebes (Tumor II, Tab. 2).

oben : V. 7 - re 1

unten: V. 7 - re 2

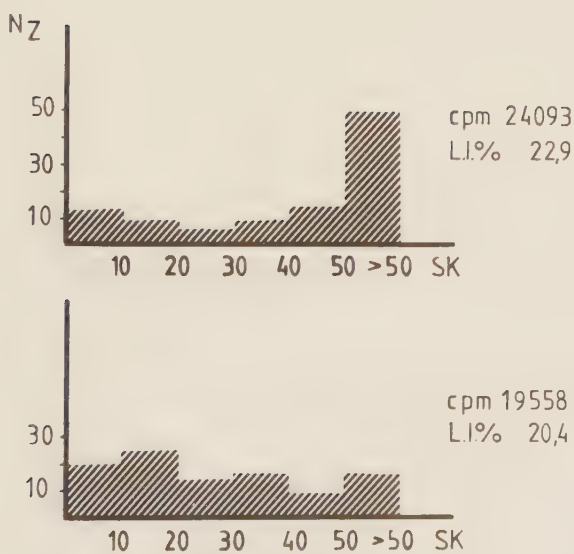


Abb. 10 Verteilung der Silberkornzahl (SK) pro Zellkern von 100 zufällig ausgewählten Zellen im Autoradiogramm mit Gegenüberstellung von Einbaurrate (cpm/mg Protein) und Markierungsindex (L.I. %) desselben Gewebes (Tumor III, Tab.2).

oben : V. 12 li - 1

unten: V. 12 li - 2

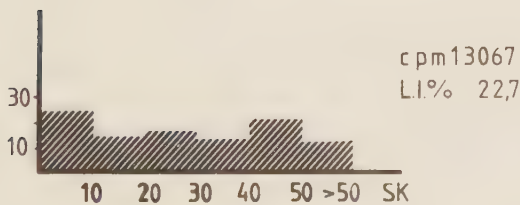
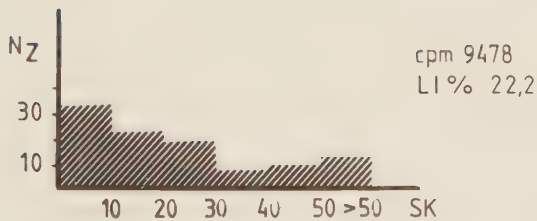


Abb. 11 Verteilung der Silberkornzahl (SK) pro Zellkern von 100 zufällig ausgewählten Zellen im Autoradiogramm mit Gegenüberstellung von Einbaurate (cpm/mg Protein) und Markierungsindex (L.I. %) desselben Gewebes (Tumor III, Tab.2).

oben : V. 13 li - 1

unten: V. 13 li - 2

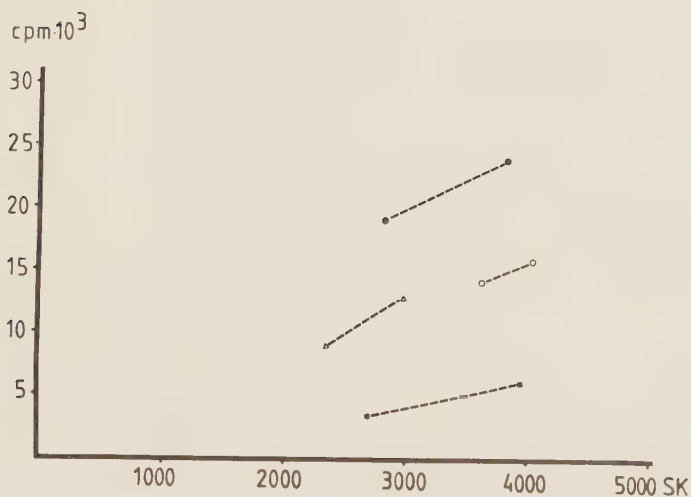


Abb. 12 Beziehung zwischen der Einbaurrate des ^3H -Thymidins (cpm/mg Protein) und der Silberkornzahl (SK/100 Zellen). Zusammenfassung der Histogramme aus Abb. 8 - 11. Mit steigender Silberkornzahl nimmt die Einbaurrate zu.

V. 4 ■ · · ■

V. 7 ○ · · ○

V. 12 ● · · ●

V. 13 △ · · △

8. Literatur

Bastert G. , H. Schmidt-Matthiesen

In vitro Sensibilitätstestung von Tumoren gegenüber aktiviertem Cyclophosphamid. Kurzzeitin-
kubation von Originalzumorzellen und ^3H -Thymidin
Einbau.

Z. Krebsforsch. 84 , 37 - 47 , (1975)

Bastert G. , G. Voelcker, G. Peter, H. Schmidt-Matthiesen,
H.J. Hohorst

Zum Problem der in vitro-Sensibilitätstestung
von Tumoren gegen Cyclophosphamid. ^3H -Uridin-
einbau in Ribonukleinsäure menschlicher Tumor-
zellen nach Inkubation mit 4-Hydro-peroxy-
Cyclophosphamid. 2. Mitteilung.

Z. Krebsforsch. 85 , 299 - 307 , (1976)

Bastert G. , H. Schmidt-Matthiesen, R.T. Michel, H.P.
Fortmeyer, R. Sturm, D. Nord, R. Gerner

Human Mammary Cancers in nu/nu Mice.

A Model for Testing in Research and Clinic.
Klin. Wschr. 55 , 83 - 84 , (1977)

Bastert G. , R.T. Michel, D. Nord, H.P. Fortmeyer, R. Sturm,
R. Gerner, H. Schmidt-Matthiesen

Heterotransplantation menschlicher Tumoren auf
thymusaplastische nu/nu Mäuse. Ein Modell für
die klinische Onkologie zur Prüfung zytostati-
scher, hormoneller und radiologischer Therapie-
formen an Individualtumoren.

Habilitationsschrift, Frankfurt 1977

Dörmer P.

Auflichtphotometrische Untersuchungen zur
Größe der Koinzidenz in der Autoradiographie
mit Tritium.

Histochemie 8 , 1 - 8 , (1967)

Epstein A.L. , M.M. Hermann, H. Kim, R.F. Dorfman,
M.R.C. Path, H.S. Kaplan

Biology of the human malignant lymphomas.
Intracranial heterotransplantation in the
nude, athymic mouse.

Cancer 37 , 2158 - 2176 , (1976)

Feinendegen L.E.

Autoradiographische und biochemische Unter-
suchungen der Zellproliferation in vivo.

In: Präoperative Tumorbestrahlung

Ed. O. Hug 12 - 21 (1971)

Urban und Schwarzenberg München, Berlin, Wien

- Fridland A.
DNA Precursors in Eukaryotic Cells
Nature New Biology 243 , 105 - 107 , (1973)
- Ganzer U.
Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des
Zytostatikums Bleomycin.
Laryng. Rhinol. 57 , 177 - 186 , (1978)
- Ganzer U. , S. Martin
The Distribution of Feulgen Stained Nuclei in
the Peryphery of Human Head and Neck Tumors.
Cytophotometric Investigations
Arch. Oto-Rhino-Laryng. 220 , 231 - 233 , (1978)
- Hubbard R.W. , W.T. Matthew, D.A. Dubowik
Factors Influencing the Determination of
DNA with Indole
Analytical Biochemistry 38 , 190 - 201 , (1970)
- Hughes W.L. , S.L. Commerfeld, D. Gitlin, R.C. Krueger,
B. Schulze, V. Shah, P. Reilly
Deoxyribonucleid acid metabolism in vivo:
I. Cell proliferation and death as measured
by incorporation and elimination of
iododeoxyuridine.
Fed. Proc. 23 , 640 - 648 , (1964)
- Klein H.O. , K.J. Lennartz, R. Gross, M. Eder, R. Fischer
In vivo und in vitro Untersuchungen zur Zell-
kinetik und Synchronisation menschlicher
Tumoren.
Dtsch. Med. Wschr. 97 , 1273 - 1282 , (1972)
- Krause P.H. , R. Schmitz, M. Lindemann, A. Georgii
Xenotransplantation etablierter Tumorzellen
auf kongenital thymuslose "nude"-Mäuse
Z. Krebsforsch. 83 , 177 - 186 , (1975)
- Kummer D.
Cytostatika-Sensibilitätstest solider, maligner
Tumoren in vitro zur gezielten kombinierten
operativen und chemotherapeutischen Behandlung
des Krebsleidens.
Z. Krebsforsch. 76 , 124 - 139 , (1971)
- Lederer B.
Zytophotometrische und autoradiographische
Untersuchungen der DNS-Synthese eines hyper-
diploiden Ehrlich-Aszites-Tumor.
Beitr. Path. 142 , 1 - 22 , (1970)
- Lindenberger J. , U. Ganzer
Heterotransplantation of Human Adenoid Cystic
Carcinoma on Thymusaplastic Nude Mice (nu/nu
mice)
Arch. Oto-Rhino-Laryng. 215 , 179 - 181 , (1977)

- Lindenberger J. , U. Ganzer, H.P. Fortmeyer
 Die Heterotransplantation bösartiger Kopf- und Halsgeschwülste auf thymusaplastische nackte Mäuse
 Arch. Oto-Rhino-Laryng. 220 , 117 - 128 , (1978)
- Lindner J. , G. Freytag, K. Grasedyck
 Über vergleichende autoradiographische und quantitative radiochemische Untersuchungen am gleichen Material.
 Acta Histochem. VIII. Suppl. 177 - 198 , (1968)
- Lowry O.H. , N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall
 Protein measurement with the Folin phenol reagent.
 J. Biol. Chem. 193 , 265 - 275 , (1951)
- Mans R.J. , G.C. Novelli
 Measurement of the Incorporation of Radioactive Amino Acids into Protein by a Filter-Paper Disk Method
 Arch. Biochem. Biophys. 94 , 48 - 53 , (1961)
- Martin S.
 Zytrophotometrische Untersuchungen zur Verteilung von DNA synthetisierenden Zellen in der Peripherie menschlicher Kopf- und Halsgeschwülste
 Inaugural-Dissertation,
 Johann Wolfgang Goethe-Universität
 Frankfurt am Main (1978)
- Maurer W. , E. Koburg
 Autoradiographische Untersuchungen mit H-3-Thymin über den zeitlichen Verlauf der DNS-Synthese bei den Epithelien des Darms und bei anderen Zellarten der Maus.
 Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 45. Tagung gehalten in Münster Mai 1961
- Maurer W. , E. Primbsch
 Größe der B-Selbstabsorption bei der 3H-Autoradiographie.
 Exp. Cell Res. 33 , 8 - 18 , (1964)
- Nensa R.
 Die Verteilung DNA-synthetisierender Zellen in der Peripherie menschlicher Oro-Pharynx-Karzinome und in ihren Heterotransplantaten auf der thymusaplastischen nackten Maus.
 Dissertation, Universität Düsseldorf (1979)

- Oehlert W. , P. Dörmer, R. Lesch
 Autoradiographische Untersuchungen über die
 DNS-Synthese im überlebenden Tumorgewebe des
 Menschen
 Beitr. path. Anat. 128 , 468 - 480 , (1963)
- Pilgrim C. , K.J. Lennartz, K. Wegener, S. Hollweg,
 W. Maurer
 Autoradiographische Untersuchungen über tages-
 zeitliche Schwankungen des ^3H -Index und des
 Mitose-Index bei Zellarten der ausgewachsenen
 Maus, des Ratten Fetus sowie Aszites-Tumorzellen
 Z. Zellforsch. 68 , 138 - 154 , (1965)
- Povlsen C.O. , P.J. Fialkov, E. Klein, G. Klein,
 J. Rygaard, F. Wiener
 Growth and antigenic properties of a biopsy-
 derived Burkitt lymphoma in thymus-less (nude)
 mice.
 Int. J. Cancer 11 , 30 - 39 , (1974)
- Povlsen C.O. , J. Visfeldt, J. Rygaard, G. Jensen
 Growth patterns and chromosome constitutions
 of human malignant tumors after longterm serial
 transplantation in nude mice.
 Acta path. microbiol. scand. Sect. A,
83 , 709 - 716 , (1975)
- Rajewsky M.F.
 Zellproliferation in normalen und malignen
 Geweben: ^3H -Thymidin-Einbau in vitro unter
 Standardbedingungen.
 Biophysik 3 , 65 - 93 , (1966)
- Rajewsky M.F. , D.F. Hülser, E. Fabricius
 Untersuchungen zur Synchronisation in vivo:
 Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch
 Hydroxyharnstoff in normalen und malignen
 Säugerzellsystemen.
 Z. Krebsforsch. 76 , 266 - 292 , (1971)
- Romeis B.
 Mikroskopische Technik
 Oldenbourg Verlag München, Wien
 16. Auflage , (1968)
- Schmidt G. , S.J. Thannhauser
 A method for the determination of desoxyribo-
 nucleid acid, ribonucleid acid, and phospho-
 proteins in animal tissues
 Biolog. Chemistry 161 , 83 - 89 , (1945)
- Volm M. , R. Spielhoff, R. Süss
 Schnellbestimmung der DNS-Synthese mit
 ^3H -Thymidin
 Naturwissenschaften 55 , 390 - 391 , (1968)

- Volm M. , K. Kaufmann, H. Hinderer, K. Goerttler
Schnellmethode zur Sensibilitätstestung
maligner Tumoren gegenüber Zytostatika.
Klin. Wschr. 48 , 374 - 376 , (1970)
- Volm M. , M. Kaufmann, K. Wayss, K. Goerttler, J. Mattern
Gezielte Tumor-Chemotherapie durch Onkobio-
gramme
Dtsch. Med. Wschr. 99 , 38 - 43 , (1974)
- Wüst G.
Selektive Chemotherapie menschlicher Tumoren
Med. Welt 50 , 3035 - 3042 , (1967)
- Wüst G.
Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegen
Zytostatika in vitro und in vivo
Münch. med. Wschr. 115 , 839 - 842 , (1973)
- Wüst G.
Der In-vitro Effekt von Zytostatika auf den
Einbau von Nukleinsäurepräkursoren in Tumoren.
In: Aktuelle Probleme der Therapie maligner
Tumoren
Ed. G. Wüst, 43 - 56 , (1973)
Gustav Thieme Verlag, Stuttgart

9. Lebenslauf

Am 26. Sept. 1948 wurde ich in Braunschweig als Sohn der Eheleute Hermine und Rolf Stumpe geboren.

1955 - 1963 Besuch der Volksschule in Roetgen/Eifel;

1963 - 1966 Lehrzeit als Maschinenbauer, während dieser Zeit besuchte ich die Berufsschule in Stolberg;

1967 - 1968 Besuch der Berusaufbauschule Aachen (Abendschule);

1969 - 1970 Besuch der Fachschule für Metalltechnik in Solingen;

1971 Eheschließung mit Frau Ingrid Stumpe geb. Arents;

1970 - 1972 Tätigkeit als technischer Vertriebsangestellter und Konstrukteur in Aachen, Stuttgart und Düsseldorf;

1972 - 1974 Besuch des Friedrich-Spee-Kollegs in Neuss zur Erlangung der allgemeinen Hochschulreife am 21.06.1974;

WS 1974 Aufnahme des Studiums der Zahnheilkunde an der Universität Düsseldorf;

SS 1975 Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung an der Universität Düsseldorf;

WS 1977 Ablegung der zahnärztlichen Vorprüfung an der Universität Düsseldorf;

im Sommer 1979 werde ich voraussichtlich mein Staatsexamen an der Universität Düsseldorf ablegen.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ganzer danke ich für die Überlassung des Themas meiner Dissertation sowie für die Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. K.-H. Vosteen bedanke ich mich für die Möglichkeit, in den Labors seiner Klinik arbeiten zu können.

Frau Dr. Orsulakova gilt mein Dank für die Einführung in die Methodik der Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie.

Für die Bereitstellung der nackten Mäuse habe ich Herrn Dr. Lindenberger zu danken.

Für die Unterstützung bei der Anfertigung der Autoradiogramme danke ich Frau Ulrike Kostka und Frä. Martina Jansen.

